

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

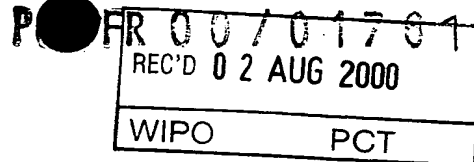
- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**



FR00/1761

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

## BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

10/018884

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 05 JUIL. 2000

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

10/01/88

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ  
Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

certificat  
N° 55-132

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **25 JUIN 1999**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9908135**  
DEPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**  
DATE DE DÉPÔT **25 JUIN 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**GROSSET-FOURNIER & DEMACHY**  
**20, rue de Maubeuge**  
**75009 PARIS**

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☒ demande initiale



☒ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent références du correspondant

**IFB 98 BC CNR PHY**

téléphone

**01.42.81.09.81**

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**UTILISATION DE POLYMERES 1,4  $\beta$ -D-GLUCURONANES ET  
D'OLIGOSACCHARIDES GLYCURONIQUES DERIVES EN TANT QUE  
PRODUITS PHYTOSANITAIRES ET/OU BIOFERTILISANTS**

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

**C.N.R.S.**

**(Centre National de la Recherche Scientifique)**

Forme juridique

Nationalité (s) **FRANCAISE**

Adresse (s) complète (s)

Pays

**FRANCE**

**3, rue Michel-Ange**  
**75794 PARIS CEDEX 16**

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐ Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

**DEMACHY, Charles**  
**422.5/PP170**

*[Signature of Charles Demachy]*

*[Signature of Préposé à la Réception]*

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 08135

TITRE DE L'INVENTION :

UTILISATION DE POLYMERES 1,4  $\beta$ -D-GLYCURONANES ET D'OLIGOSACCHARIDES DERIVES EN  
TANT QUE PRODUITS PHYTOSANITAIRES ET/OU FERTILISANTS.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

C. N. R. S.

(Centre National de la Recherche Scientifique).

3, rue Michel-Ange

F - 75794 PARIS CEDEX 16-

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

LIENART, Yvette

Saint Nizier D'Uriage

38410 URIAGE

HEYRAUD, Alain

6, Côte du Verdaret

38113 VEUREY VOROIZE

SEVENOU, Olivier

1 High Street

KEGWORTH DE74 2DA

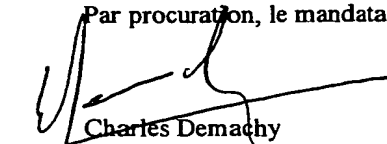
ANGLETERRE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 7 septembre 1999

Par procuration, le mandataire

  
Charles Demachy  
422.5/PP170

# DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDEICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
1-14			RM	9-12-99	17 DEC. 1999 = V M

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

## UTILISATION DE POLYMERES 1,4 $\beta$ -D-GLYCURONANES ET D'OLIGOSACCHARIDES DERIVES EN TANT QUE PRODUITS PHYTOSANITAIRES ET/OU FERTILISANTS

---

5

La présente invention a pour objet l'utilisation de polymères 1,4  $\beta$ -D-glycuronanes, ou polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes, et d'oligosaccharides dérivés en tant que produits phytosanitaires et/ou fertilisants.

10 L'enzyme 1,3- $\beta$ -D-glucanase est un marqueur de réactions de défense chez les végétaux. Au cours de réactions d'hypersensibilité à un pathogène (bactéries, champignons, virus) la plante réagit en induisant la synthèse de protéines spécifiques nommées "PR-protéines" (Sintzi A. et al. (1993) Biochimie, 75, 687-706). Ces protéines liées à la pathogénèse concourent, avec d'autres molécules (comme l'acide salicylique) au développement d'une résistance au pathogène. Selon leurs propriétés biochimiques, et leur  
15 fonction physiologique, ces protéines sont répertoriées en plusieurs groupes. Elles présentent, en commun, les caractéristiques suivantes: bas poids moléculaire, composition le plus souvent monomérique, leur résistance à la protéolyse, leur stabilité en milieu acide ou à des températures extrêmes, leur association à des membranes plasmiques ou endoplasmiques, leur localisation pariétale. Parmi, ces PR-protéines se situe le groupe 2  
20 composé d'enzymes 1,3  $\beta$ -D-glucanases, qui reconnaissent comme substrats des chaînes 1,3  $\beta$ -D-glucanes. Le rôle de ces protéines dans la défense de la plante repose sur leur capacité à lyser les parois des pathogènes riches en 1,3  $\beta$ -D-glucanes (Boller T. (1993) In mechanisms of Plant defenses responses. Fritig B. Legrand M. eds. Kluwer. Academic Publishers Dordrecht, 391-400.

25 Cependant, cette activité enzymatique n'est pas seulement impliquée dans la défense des plantes. En effet, elle peut être régulée par des phytohormones et elle peut être induite à certains stades de développement de la plante. A ce titre, l'enzyme 1,3- $\beta$ -D-glucanase est un marqueur de croissance et/ou de différenciation cellulaire chez les végétaux

30 Cette enzyme comme d'ailleurs un certain nombre de PR-protéines (inhibiteurs de protéase, chitinases, protéines régulant l'expression de gènes codant pour l'osmotine) sont



associées à la croissance et/ou à la différenciation cellulaire ou bien à des processus d'adaptation à l'environnement. Certaines de ces protéines sont reconnues par des anticorps dirigés contre des 1,3- $\beta$ -D-glucanases isolées du tabac contaminé par la mosaïque du tabac (Kauffmann et al. (1990) Plant Mol. Biol., 14(3) : 381-90).

5 Des activités 1,3- $\beta$ -D-glucanases ou les gènes codant pour ces protéines sont induit(e)s au cours de la germination, du développement des bourgeons floraux, des fruits (del Campillo E., Lewis L.N. (1992) Plant Physiology 99, 1015-1020; Neale et al. (1990) Plant Cell 2, 7, 673-684). En particulier, ces réponses se développent dans des tissus en  
10 voie de remaniements cataboliques (endosperme, tubes polliniques, zones d'abscission de tiges, de pédoncules..) ou en période de division mitotique (cas des anthères, des stigmas, de tiges). Elles sont sous dépendance hormonale (auxines, cytokinines en général, acide abscissique en particulier), et des molécules comme l'éthylène, contrôlant la maturation des fruits, ou l'acide salicylique, contrôlant la floraison, sont également des inducteurs. Enfin, des enzymes 1,3  $\beta$ -D-glucanases ont été répertoriées pour des fonctions d'adaptation de la  
15 plante au froid et à des teneurs élevées en ozone (Hinch et al. (1997) Plant physiology 114, 1077-1083).

L'enzyme 1,4- $\beta$ -D-glucanase est un marqueur de croissance et/ou de différenciation cellulaire chez les végétaux. Cette enzyme reconnaît comme substrat des chaînes linéaires de glucanes liés en  $\beta$  (1,4). Elle peut hydrolyser la cellulose, des glucanes  $\beta$  (1,4) (1,6), le  
20 xyloglucane. Ainsi, elle intervient dans les remaniements ultrastructuraux des parois des cellules végétales en cours de croissance. Son induction et/ou celle des gènes spécifiques se décèlent au cours des processus impliquant la lyse des parois végétales, rupture des anthères, zones d'abscission de fruits, de fleurs (Hayaschi T., Oshimi C. (1994) Plant Cell Physiology 35(3), 419-424; Brummel D.A. et al. (1997) Plant Biol. Mol. 33, 1, 97-195).  
25 Elle est contrôlée par l'éthylène, par des hormones comme l'acide abscissique ou l'auxine.

La présente invention découle de la mise en évidence par les inventeurs du fait que les polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes et les oligosaccharides dérivés de ces derniers, ont des activités d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase et/ou de l'enzyme 1,4  $\beta$ -D-glucanase, et, à ce titre, sont désignés composés "éliciteurs", susceptibles d'être utilisés dans  
30 le cadre d'applications phytosanitaires ou de fertilisation.

Les polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes ont déjà été décrits dans le brevet français FR-B-2 688 222 du 3 mars 1992, dans des domaines d'utilisation totalement différents de ceux susmentionnés de la présente invention, à savoir dans les domaines alimentaire, pharmaceutique en thérapeutique humaine ou vétérinaire, cosmétique ou de l'épuration des eaux, en particulier en tant que moyen gélifiant, épaississant, hydratant, stabilisant, chélatant ou floculant, ainsi que dans la préparation d'oligosaccharides.

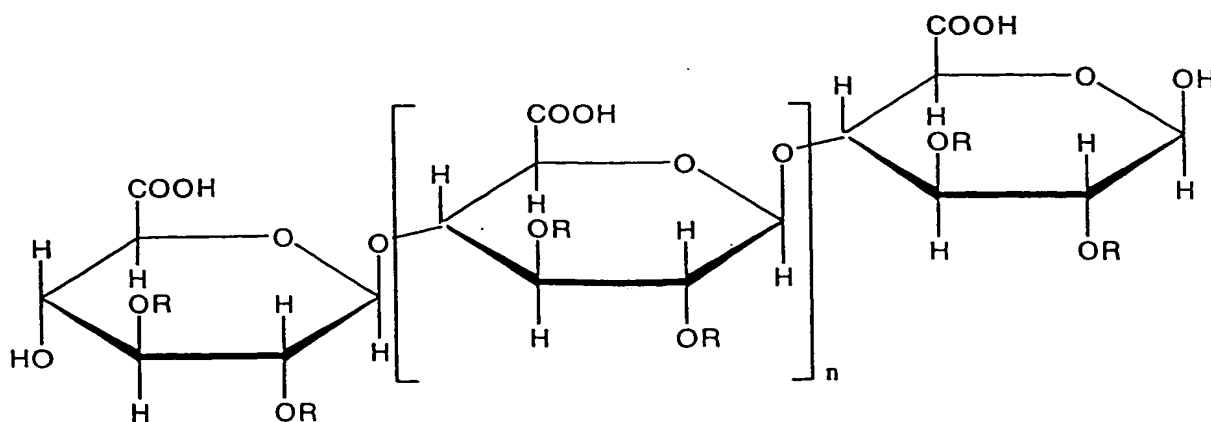
La présente invention a pour but de fournir des composés utilisables en tant "qu'éliciteurs" entrant dans la composition de fertilisants (engrais, fertilisants biologique ou biofertilisants), et de produits phytosanitaires.

Un des buts de la présente invention est de fournir de nouveaux biofertilisants utilisables notamment comme stimulants de la nutrition en complément ou en remplacement de produits commerciaux à base de potasse et de nitrates toxiques pour l'environnement, et/ou comme régulateurs d'une ou plusieurs étapes du développement des plantes.

Un autre but de la présente invention est de fournir de nouveaux produits phytosanitaires utilisables notamment comme activateurs des réactions de défense et de résistance contre des contraintes biotiques ou abiotiques en complément ou en remplacement de pesticides toxiques pour l'environnement.

La présente invention a pour objet l'utilisation de composés choisis parmi :

- les polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de formule (I) suivante :



dans laquelle  $n$  est un nombre entier pouvant atteindre jusqu'à environ 2500, avantageusement  $n$  est compris entre environ 300 et environ 2500, et  $R$  représente  $H$  ou  $COCH_3$ ,

- et/ou les oligosaccharides dérivés des polymères de formule (I), et dont le nombre d'unités saccharidiques est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15,

- et /ou les esters et/ou éthers correspondants aux polymères de formule (I) ou aux dérivés oligosaccharidiques susmentionnés,

\* en tant que produits phytosanitaires dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase,

\* et/ou en tant que biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase et/ou de l'enzyme 1,4  $\beta$ -D-glucanase.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, des composés choisis parmi ceux cités ci-dessus, en tant que produits phytosanitaires dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase, telles que la protection des plantes contre des pathogènes ou des prédateurs, notamment contre les bactéries, virus, champignons, insectes, nématodes, ou l'adaptation des plantes à un stress abiotique, notamment l'adaptation au froid ou à des teneurs élevées en ozone.

Parmi les plantes susceptibles d'être traitées dans le cadre de la présente invention, on peut citer la vigne, les arbres fruitiers, les cultures céréalières et maraîchères ou tout autre végétal d'intérêt économique.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation, à titre de produits phytosanitaires, des polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de formule (I) dans laquelle  $n$  est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et  $R$  représente  $H$ .

L'invention a également plus particulièrement pour objet l'utilisation en tant que produits phytosanitaires, des polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de formule (I) dans laquelle  $n$  est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500,  $R$  représente  $H$  ou  $COCH_3$ , le pourcentage de  $COCH_3$  en poids étant de préférence compris entre 0 et 30,5.

L'invention concerne également l'utilisation en tant que produits phytosanitaires, des oligosaccharides glycuroniques à enchaînement  $\beta(1-4)$ , tels que les oligo 1,4  $\beta$ -D-

glucuronane, les oligo 1,4  $\beta$ -D-mannuronane, et les oligo 1,4  $\beta$ -D-guluronane, dont le DP (degré de polymérisation) est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15.

On entend dans ce qui suit par l'expression "oligosaccharide de degré de polymérisation x (DPx)" des oligosaccharides constitués du même nombre x d'unités saccharidiques, et par l'expression "oligosaccharide de degré de polymérisation moyen x (DP moyen x)" des oligosaccharides constitués d'un nombre variable d'unités saccharidiques et dont la moyenne correspond au nombre x.

Des dérivés oligosaccharidiques préférés en tant que produits phytosanitaires, sont choisis parmi les suivants :

- les oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de DP8, et de DP moyen 8,
- l'oligo 1,4  $\beta$ -D-mannuronane de DP4,
- l'oligo 1,4  $\beta$ -D-guluronane de DP4.

L'invention concerne également l'utilisation des composés choisis parmi ceux cités ci-dessus, en tant que produits biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase et/ou de l'enzyme 1,4  $\beta$ -D-glucanase.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, des oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronane, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15, en tant que produits biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase et de l'enzyme 1,4  $\beta$ -D-glucanase, notamment dans le cadre du contrôle d'une ou plusieurs étapes de développement des plantes, tels que le contrôle de la maturation des fruits, de l'abscission, de la croissance du pistil ou de la maturation des anthères.

L'invention a encore plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, des oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de DP8 et de DP moyen 8, en tant que produits biofertilisants.

L'invention concerne également les produits phytosanitaires et/ou biofertilisants caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un composé choisi parmi :

- les polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de formule (I) susmentionnée dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H ou COCH<sub>3</sub>,

- et/ou les oligosaccharides dérivés des polymères de formule (I), et dont le nombre d'unités saccharidiques est inférieur à environ 30,

- et /ou les esters et/ou éthers correspondants aux polymères de formule (I) ou aux dérivés oligosaccharidiques susmentionnés.

5 L'invention a plus particulièrement pour objet les produits phytosanitaires comprenant au moins un polymère 1,4  $\beta$ -D-glucuronane de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H.

10 L'invention concerne également les produits phytosanitaires comprenant au moins un polymère 1,4  $\beta$ -D-glucuronane de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, R représente H ou  $\text{COCH}_3$ , le pourcentage de  $\text{COCH}_3$  en poids étant de préférence compris entre 0 et 30,5.

15 L'invention a également pour objet les produits phytosanitaires comprenant au moins un oligosaccharide glucuronane à enchaînement  $\beta(1-4)$ , tels que les oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronane, les oligo 1,4  $\beta$ -D-mannuronane, et les oligo 1,4  $\beta$ -D-guluronane, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15.

L'invention a plus particulièrement pour objet les produits phytosanitaires comprenant au moins un dérivé oligosaccharidique choisi parmi les suivants :

- les oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de DP8, et de DP moyen 8,
- l'oligo 1,4  $\beta$ -D-mannuronane de DP4,
- l'oligo 1,4  $\beta$ -D-guluronane de DP4.

20 L'invention concerne plus particulièrement les produits biofertilisants comprenant au moins un oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronane, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15, et, de préférence, les produits biofertilisants comprenant les oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de DP8, et de DP moyen 8.

25 L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de la préparation des polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes et oligosaccharides dérivés selon l'invention, ainsi que de la mise en évidence de leurs propriétés d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase, et/ou de l'enzyme 1,4  $\beta$ -D-glucanase.

### A) Préparation des polymères uroniques et/ou de leurs oligosaccharides

L'obtention des polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes fait appel, de préférence, à des procédés de fermentation de souches bactériennes isolées de la rhizosphère (*Rhizobium*,  
5 *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*...), modifiées ou non par mutations chimiques et/ou manipulations génétiques.

Le cas échéant, les polymères ainsi obtenus sont modifiés et/ou dégradés par voies chimiques et/ou enzymatiques, en cours de fermentation ou par des traitements post-fermentaires.  
10

- Polymère 1,4  $\beta$ -D-glucuronane

A titre d'illustration, le polymère 1,4  $\beta$ -D-glucuronane est obtenu par fermentation d'une souche mutée de *Rhizobium meliloti*, selon le protocole décrit dans le brevet français  
15 FR-B-2 688 222 du 3 mars 1992.

- Oligomère 1,4- $\beta$ -D-glucuronane de DP moyen 8

Le polymère précédent natif, c'est-à-dire comportant au moins 50% d'unités glucuroniques acétylées en C2 et/ou C3, est soumis à une hydrolyse enzymatique. L'enzyme  
20 est une glucuronate lyase d'origines diverses, notamment extraite de pancréas d'ormeaux, ou d'origine fongique (Dantas L. et al., Carbohydr. Res., 265 (1994) 303-310) ou une glucuronate lyase présente dans le milieu de culture de bactéries telles que les souches de rhizobiaceae (Michaud P., et al., Int. J. Biol. Macromol. 21 (1997) 3-9). Le mélange d'oligosaccharides ainsi obtenu est déacétylé par traitement basique (NaOH 0,1M ), puis  
25 fractionné en fonction du degré de polymérisation (DP) par chromatographie de perméation de gel sur colonne de Bio-Gel P6 (Dantas L. et al., susmentionné).

- Oligomères 1,4  $\beta$ -D-mannuronane et 1,4  $\beta$ -D-guluronane de DP 4

Le polymère de départ est un alginat, copolymère linéaire des acides mannuronique  
30 (M) et guluronique (G) dont le rapport M/G et le mode d'arrangement dépendent de

l'origine. L'alginate est choisi en fonction du type d'oligomères à préparer. L'hydrolyse se fait par voie enzymatique: une alginate-lyase d'ormeau pour les oligo-1,4 $\beta$ -D-mannuronane (Heyraud A. et al., Carbohydr. Res., 291 (1996) 115-126), une alginate-lyase d'origine bactérienne pour les oligo-1,4  $\beta$ -D-guluronane (brevet FR 97 03218 du 11 mars 1997). Les différents oligosaccharides, séparés selon le DP par chromatographie de perméation de gel, sont ensuite purifiés selon leur structure par chromatographie ionique en chromatographie liquide haute pression selon le procédé décrit dans l'article de Heyraud et al., susmentionné.

B) Réponse 1,3- $\beta$ -D-glucanase induite dans des protoplastes de *Rubus*.

Conditions expérimentales : (1) préparation de protoplastes à partir de suspensions cellulaires de *Rubus fruticosus* L.; (2) incubation ou non de n échantillons de  $2.10^6$  protoplastes en présence "d'éléciteur" (polymères 1,4- $\beta$ -D-glucuronane et 1,4- $\beta$ -D-galacturonane (400  $\mu$ g/L), oligomères 1,4- $\beta$ -D-glucuronane de DP moyen 8, 1,4- $\beta$ -D-mannuronane de DP 4, et 1,4- $\beta$ -D-guluronane de DP 4 (50 nM); (3) après 20 min, les protoplastes traités ou non font l'objet d'une extraction enzymatique. 2  $\mu$ g de protéines sont utilisées par essai enzymatique, et par temps d'incubation. La viabilité des protoplastes est maintenu à 95 % pour une durée d'expérimentation de 6h; le test de viabilité au bleu d'Evans utilisé vérifie l'intégrité du plasmalemm.

Méthodologie : la mesure de l'activité (1,3  $\beta$ -D-glucanase) repose sur le dosage colorimétrique (test au ferricyanure) des unités réductrices du substrat (hexamère réduit de laminarine) libérées au cours de l'hydrolyse. A partir des cinétiques développées, on trace des courbes dont les équations permettent de calculer la vitesse de la réaction enzymatique. 2 cinétiques, au moins, sont développées par échantillon, et par "set" expérimental. En général, 8 cinétiques provenant d'échantillons de 2 "sets " indépendants sont, au moins, développées.

Résultats : l'activation enzymatique dans des protoplastes élicités est exprimée en % de l'activité dans les contrôles. Les résultats sont rapportés dans le tableau récapitulatif 1.

5

Tableau 1

"éliciteur"	activité (% contrôle)
a	145
b	128
c	100
d	122
e	146

10

Tableau 1: Analyse comparative des réponses (1,3- $\beta$ -D-glucanase) induites par "l'éliciteur" (polymère 1,4- $\beta$ -D-glucuronane (400  $\mu$ g/L) (a), oligo 1,4- $\beta$ -D-glucuronane de DP moyen 8 (50 nM) (b), polymère 1,4- $\beta$ -D-galacturonane (400  $\mu$ g/L) (c), oligo 1,4- $\beta$ -D-mannuronane de DP 4 (50 nM) (d), oligo 1,4- $\beta$ -D-guluronane de DP 4 (50 nM) (e).

15

L'analyse électrophorétique par SDS-PAGE des protéines composant les extraits enzymatiques a été réalisée. Le marquage de protéines sur empreintes par un sérum reconnaissant des 1,3- $\beta$ -D-glucanases isolées du tabac contaminé par la mosaïque du tabac (Ori et al. (1990) EMBO J., 9(11), 3429-36) confirme la présence de PR-protéines.

20

L'oligomère 1,4- $\beta$ -D-glucuronane de DP moyen 8 et le polyglucuronane, utilisés à une concentration nanomolaire, amplifie en 20 min d'un facteur 1.5 et 1.3 respectivement l'activité 1,3  $\beta$ -D-glucanase dans des protoplastes végétaux. Parmi les autres produits testés, c'est l'oligo 1,4- $\beta$ -D-guluronane de DP4 qui est le plus efficace.



### C) Réponse 1,4- $\beta$ -D-glucanase induite dans des protoplastes de *Rubus*.

Conditions expérimentales d'élicitation : identiques à celles rapportées ci-dessus.

5

Méthodologie : la mesure de l'activité (1,4  $\beta$ -D-glucanase) repose sur le dosage colorimétrique (test au ferricyanure) décrit ci-dessus des unités réductrices du substrat (cellopentaose réduit) libérées au cours de l'hydrolyse.

10

Résultats : les résultats sont rapportés dans le tableau 2.

Tableau 2

"éliciteur"	activité (% contrôle)
a	100
b	120
c	100
d	-
e	101

Tableau 2: Analyse comparative des réponses (1,4  $\beta$ -D-glucanase) induites par "l'éliciteur" (polymère 1,4- $\beta$ -D-glucuronane (400  $\mu$ g/L) (a), oligo 1,4- $\beta$ -D-glucuronane de DP moyen 8 (50 nM) (b), polymère 1,4- $\beta$ -D-galacturonane (400  $\mu$ g/L) (c), oligo 1,4- $\beta$ -D-mannuronane de DP 4 (50 nM) (d), oligo 1,4- $\beta$ -D-guluronane de DP 4 (50 nM) (e).

15

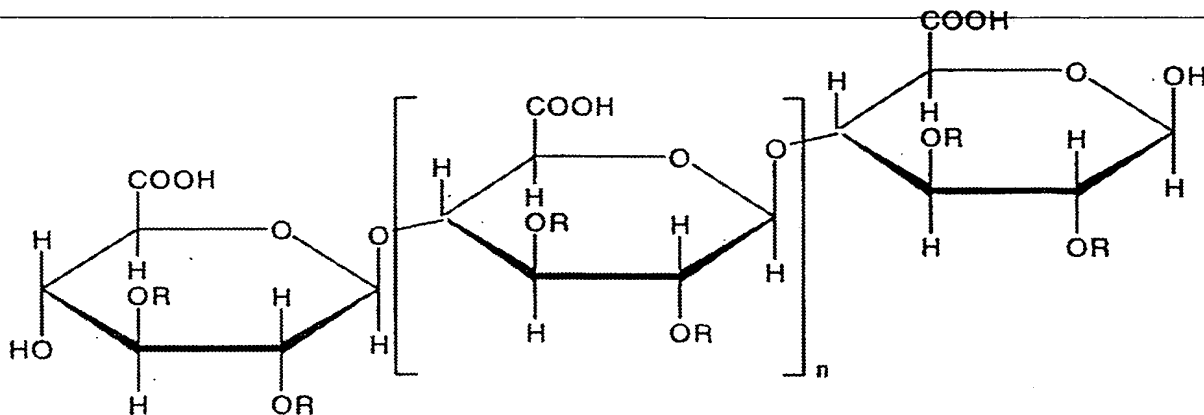
L'oligomère 1,4- $\beta$ -D-glucuronane de DP moyen 8 utilisé à une concentration nanomolaire, amplifie en 20 min d'un facteur 1.2 l'activité 1,4  $\beta$ -D-glucanase dans des protoplastes végétaux.

20

## REVENDECATIONS

### 1. Utilisation de composés choisis parmi :

- les polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de formule (I) suivante :



dans laquelle  $n$  est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et  $R$  représente  $H$  ou  $COCH_3$ ,

- et/ou les oligosaccharides dérivés des polymères de formule (I), et dont le nombre d'unités saccharidiques est inférieur à environ 30,

- et /ou les esters et/ou éthers correspondants aux polymères de formule (I) ou aux dérivés oligosaccharidiques susmentionnés,

\* en tant que produits phytosanitaires dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase,

\* et/ou en tant que biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase et/ou de l'enzyme 1,4  $\beta$ -D-glucanase.

2. Utilisation selon la revendication 1, des composés choisis parmi ceux cités dans la revendication 1, en tant que produits phytosanitaires dans le cadre d'applications liées à leur

activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase, telles que la protection des plantes contre les pathogènes, notamment contre les bactéries, les virus, les champignons, ou l'adaptation des plantes à un stress abiotique, notamment l'adaptation au froid ou à des teneurs élevées en ozone.

5

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, des polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H.

10

4. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, des polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, R représente H ou  $\text{COCH}_3$ , le pourcentage de  $\text{COCH}_3$  en poids étant de préférence compris entre 0 et 30,5.

15

5. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, d'oligosaccharides glycuroniques à enchaînement  $\beta(1-4)$ , tels que les oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronane, les oligo 1,4  $\beta$ -D-mannuronane, et les oligo 1,4  $\beta$ -D-guluronane, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15.

20

6. Utilisation selon la revendication 5, des oligosaccharides choisis parmi les suivants:

- les oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de DP8, et de DP moyen 8,
- l'oligo 1,4  $\beta$ -D-mannuronane de DP4,
- l'oligo 1,4  $\beta$ -D-guluronane de DP4.

25

7. Utilisation selon la revendication 1, des composés choisis parmi ceux cités dans la revendication 1, en tant que produits biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase et/ou de l'enzyme 1,4  $\beta$ -D-glucanase.

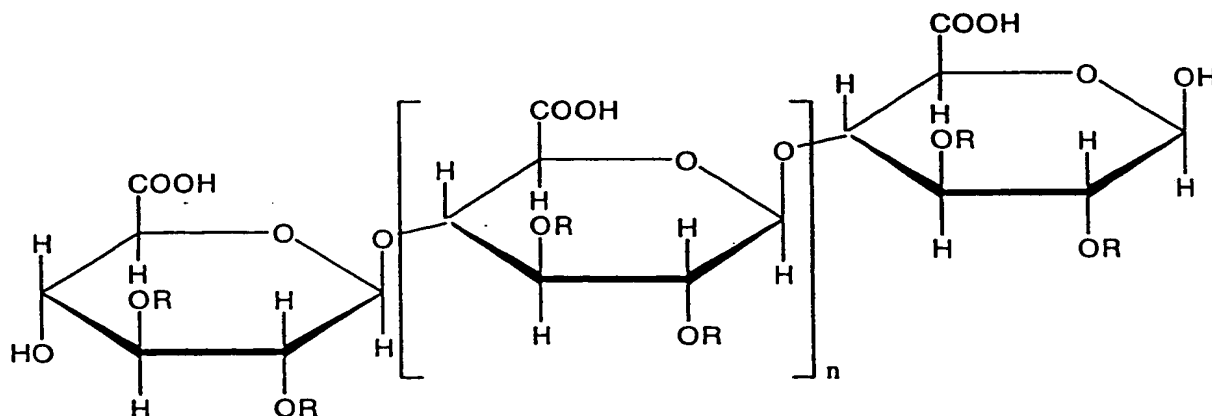
30

8. Utilisation selon la revendication 7, des oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15, en tant que produits biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase et de l'enzyme 1,4  $\beta$ -D-glucanase, notamment dans le cadre du contrôle d'une ou plusieurs étapes de développement des plantes, tels que le contrôle de la maturation des fruits, de l'abscission, de la croissance du pistil ou de la maturation des anthères.

9. Utilisation selon la revendication 8, de l'oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronane de DP moyen 8.

10. Produits phytosanitaires et/ou biofertilisants caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un composé choisi parmi :

- les polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de formule (I) suivante :



dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H ou COCH<sub>3</sub>,

- et/ou les oligosaccharides dérivés des polymères de formule (I), et dont le nombre d'unités saccharidiques est inférieur à environ 30,

- et /ou les esters et/ou ou éthers correspondants aux polymères de formule (I) ou aux dérivés oligosaccharidiques susmentionnés.

5 11. Produits phytosanitaires selon la revendication 10, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un polymère 1,4  $\beta$ -D-glucuronane de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H.

---

10 12. Produits phytosanitaires selon la revendication 10, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un oligosaccharide glycuronane à enchaînement  $\beta(1-4)$ , tels que les oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronane, les oligo 1,4  $\beta$ -D-mannuronane, et les oligo 1,4  $\beta$ -D-guluronane, dont le DP est inférieur à 20, et de préférence compris entre 5 et 15.

15 13. Produits phytosanitaires selon la revendication 12, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un oligosaccharide choisi parmi les suivants :

- les oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de DP8, et de DP moyen 8,
- l'oligo 1,4  $\beta$ -D-mannuronane de DP4,
- l'oligo 1,4  $\beta$ -D-guluronane de DP4.

20 14. Produits biofertilisants selon la revendication 10, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronane, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15, tel que l'oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronane de DP moyen 8.

## UTILISATION DE POLYMERES 1,4 $\beta$ -D-GLUCURONANES ET D'OLIGOSACCHARIDES GLYCURONIQUES DERIVES EN TANT QUE PRODUITS PHYTOSANITAIRES ET/OU FERTILISANTS

5

La présente invention a pour objet l'utilisation de polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes, et d'oligosaccharides glycuroniques dérivés, en tant que produits phytosanitaires et/ou fertilisants.

10

L'enzyme 1,3- $\beta$ -D-glucanase est un marqueur de réactions de défense chez les végétaux. Au cours de réactions d'hypersensibilité à un pathogène (bactéries, champignons, virus) la plante réagit en induisant la synthèse de protéines spécifiques nommées "PR-protéines" (Sintzi A. et al. (1993) Biochimie, 75, 687-706). Ces protéines liées à la pathogénèse concourent, avec d'autres molécules (comme l'acide salicylique) au développement d'une résistance au pathogène. Selon leurs propriétés biochimiques, et leur fonction physiologique, ces protéines sont répertoriées en plusieurs groupes. Elles présentent, en commun, les caractéristiques suivantes: bas poids moléculaire, composition le plus souvent monomérique, leur résistance à la protéolyse, leur stabilité en milieu acide ou à des températures extrêmes, leur association à des membranes plasmiques ou endoplasmiques, leur localisation pariétale. Parmi, ces PR-protéines se situe le groupe 2 composé d'enzymes 1,3  $\beta$ -D-glucanases, qui reconnaissent comme substrats des chaînes 1,3  $\beta$ -D-glucanes. Le rôle de ces protéines dans la défense de la plante repose sur leur capacité à lyser les parois des pathogènes riches en 1,3  $\beta$ -D-glucanes (Boller T. (1993) In mechanisms of Plant defenses responses. Fritig B. Legrand M. eds. Kluwer. Academic Publishers Dordrecht, 391-400.

20

25

Cependant, cette activité enzymatique n'est pas seulement impliquée dans la défense des plantes. En effet, elle peut être régulée par des phytohormones et elle peut être induite à certains stades de développement de la plante. A ce titre, l'enzyme 1,3- $\beta$ -D-glucanase est un marqueur de croissance et/ou de différenciation cellulaire chez les végétaux.

30

Cette enzyme comme d'ailleurs un certain nombre de PR-protéines (inhibiteurs de protéase, chitinases, protéines régulant l'expression de gènes codant pour l'osmotine) sont

associées à la croissance et/ou à la différenciation cellulaire ou bien à des processus d'adaptation à l'environnement. Certaines de ces protéines sont reconnues par des anticorps dirigés contre des 1,3- $\beta$ -D-glucanases isolées du tabac contaminé par la mosaïque du tabac (Kauffmann et al. (1990) Plant Mol. Biol., 14(3) : 381-90).

Des activités 1,3- $\beta$ -D-glucanases ou les gènes codant pour ces protéines sont induit(e)s au cours de la germination, du développement des bourgeons floraux, des fruits (del Campillo E., Lewis L.N. (1992) Plant Physiology 99, 1015-1020; Neale et al. (1990) Plant Cell 2, 7, 673-684). En particulier, ces réponses se développent dans des tissus en voie de remaniements cataboliques (endosperme, tubes polliniques, zones d'abscission de tiges, de pédoncules..) ou en période de division mitotique (cas des anthères, des stigmas, de tiges). Elles sont sous dépendance hormonale (auxines, cytokinines en général, acide abscissique en particulier), et des molécules comme l'éthylène, contrôlant la maturation des fruits, ou l'acide salicylique, contrôlant la floraison, sont également des inducteurs. Enfin, des enzymes 1,3  $\beta$ -D-glucanases ont été répertoriées pour des fonctions d'adaptation de la plante au froid et à des teneurs élevées en ozone (Hinch et al. (1997) Plant physiology 114, 1077-1083).

L'enzyme 1,4- $\beta$ -D-glucanase est un marqueur de croissance et/ou de différenciation cellulaire chez les végétaux. Cette enzyme reconnaît comme substrat des chaînes linéaires de glucanes liés en  $\beta$  (1,4). Elle peut hydrolyser la cellulose, des glucanes  $\beta$  (1,4) (1,6), le xyloglucane. Ainsi, elle intervient dans les remaniements ultrastructuraux des parois des cellules végétales en cours de croissance. Son induction et/ou celle des gènes spécifiques se décèlent au cours des processus impliquant la lyse des parois végétales, rupture des anthères, zones d'abscission de fruits, de fleurs (Hayaschi T., Oshimi C. (1994) Plant Cell Physiology 35(3), 419-424; Brummel D.A. et al. (1997) Plant Biol. Mol. 33, 1, 97-195). Elle est contrôlée par l'éthylène, par des hormones comme l'acide abscissique ou l'auxine.

La présente invention découle de la mise en évidence par les inventeurs du fait que les polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes et les oligosaccharides glycuroniques dérivés de ces derniers, ont des activités d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase et/ou de l'enzyme 1,4  $\beta$ -D-glucanase, et, à ce titre, sont désignés composés "éliciteurs", susceptibles d'être utilisés dans le cadre d'applications phytosanitaires ou de fertilisation.

Les polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes ont déjà été décrits dans le brevet français FR-B-2 688 222 du 3 mars 1992, dans des domaines d'utilisation totalement différents de ceux susmentionnés de la présente invention, à savoir dans les domaines alimentaire, pharmaceutique en thérapeutique humaine ou vétérinaire, cosmétique ou de l'épuration des eaux, en particulier en tant que moyen gélifiant, épaississant, hydratant, stabilisant, chélatant ou floculant, ainsi que dans la préparation d'oligosaccharides.

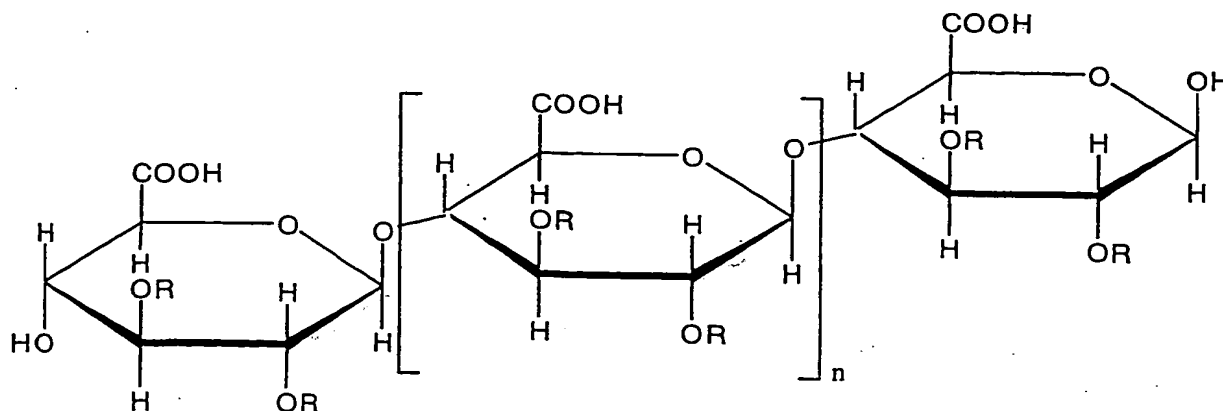
La présente invention a pour but de fournir des composés utilisables en tant "qu'éliciteurs" entrant dans la composition de fertilisants (engrais, fertilisants biologiques ou biofertilisants), et de produits phytosanitaires.

Un des buts de la présente invention est de fournir de nouveaux biofertilisants utilisables notamment comme stimulants de la nutrition en complément ou en remplacement de produits commerciaux à base de potasse et de nitrates toxiques pour l'environnement, et/ou comme régulateurs d'une ou plusieurs étapes du développement des plantes.

Un autre but de la présente invention est de fournir de nouveaux produits phytosanitaires utilisables notamment comme activateurs des réactions de défense et de résistance contre des contraintes biotiques ou abiotiques en complément ou en remplacement de pesticides toxiques pour l'environnement.

La présente invention a pour objet l'utilisation de composés choisis parmi :

- les polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de formule (I) suivante :





dans laquelle n est un nombre entier pouvant atteindre jusqu'à environ 2500, avantageusement n est compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H ou  $\text{COCH}_3$ ,

- et/ou les oligosaccharides glycuroniques à enchaînement  $\beta(1-4)$  dérivés des polymères de formule (I), et dont le nombre d'unités saccharidiques est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15,

~~- et/ou les esters et/ou éthers correspondants aux polymères de formule (I) ou aux dérivés oligosaccharidiques susmentionnés,~~

\* en tant que produits phytosanitaires dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase,

\* et/ou en tant que biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase et/ou de l'enzyme 1,4  $\beta$ -D-glucanase.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, des composés choisis parmi ceux cités ci-dessus, en tant que produits phytosanitaires dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase, telles que la protection des plantes contre des pathogènes ou des prédateurs, notamment contre les bactéries, virus, champignons, insectes, nématodes, ou l'adaptation des plantes à un stress abiotique, notamment l'adaptation au froid ou à des teneurs élevées en ozone.

Parmi les plantes susceptibles d'être traitées dans le cadre de la présente invention, on peut citer la vigne, les arbres fruitiers, les cultures céréalières et maraîchères ou tout autre végétal d'intérêt économique.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation, à titre de produits phytosanitaires, des polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H.

L'invention a également plus particulièrement pour objet l'utilisation en tant que produits phytosanitaires, des polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, R représente H ou  $\text{COCH}_3$ , le pourcentage de  $\text{COCH}_3$  en poids étant de préférence compris entre 0 et 30,5.

L'invention concerne également l'utilisation en tant que produits phytosanitaires, des oligosaccharides glycuroniques à enchaînement  $\beta(1-4)$ , tels que les oligo 1,4  $\beta$ -D-

glucuronane, les oligo 1,4  $\beta$ -D-mannuronane, et les oligo 1,4  $\beta$ -D-guluronane, dont le DP (degré de polymérisation) est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15.

On entend dans ce qui suit par l'expression "oligosaccharide de degré de polymérisation x (DPx)" des oligosaccharides constitués du même nombre x d'unités saccharidiques, et par l'expression "oligosaccharide de degré de polymérisation moyen x (DP moyen x)" des oligosaccharides constitués d'un nombre variable d'unités saccharidiques et dont la moyenne correspond au nombre x.

Des dérivés oligosaccharidiques glycuroniques préférés en tant que produits phytosanitaires, sont choisis parmi les suivants :

- les oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de DP8, et de DP moyen 8,
- l'oligo 1,4  $\beta$ -D-mannuronane de DP4,
- l'oligo 1,4  $\beta$ -D-guluronane de DP4.

L'invention concerne également l'utilisation des composés choisis parmi ceux cités ci-dessus, en tant que produits biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase et/ou de l'enzyme 1,4  $\beta$ -D-glucanase.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, des oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronane, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15, en tant que produits biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase et de l'enzyme 1,4  $\beta$ -D-glucanase, notamment dans le cadre du contrôle d'une ou plusieurs étapes de développement des plantes, tels que le contrôle de la maturation des fruits, de l'abscission, de la croissance du pistil ou de la maturation des anthères.

L'invention a encore plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée, des oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de DP8 et de DP moyen 8, en tant que produits biofertilisants.

L'invention concerne également les produits phytosanitaires et/ou biofertilisants caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un composé choisi parmi :

- les polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de formule (I) susmentionnée dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H ou COCH<sub>3</sub>,

- et/ou les oligosaccharides glycuroniques à enchaînement  $\beta(1-4)$  dérivés des polymères de formule (I), et dont le nombre d'unités saccharidiques est inférieur à environ 30,

- et /ou les esters et/ou éthers correspondants aux polymères de formule (I) ou aux dérivés oligosaccharidiques susmentionnés.

L'invention a plus particulièrement pour objet les produits phytosanitaires comprenant au moins un polymère 1,4  $\beta$ -D-glucuronane de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H.

L'invention concerne également les produits phytosanitaires comprenant au moins un polymère 1,4  $\beta$ -D-glucuronane de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, R représente H ou  $\text{COCH}_3$ , le pourcentage de  $\text{COCH}_3$  en poids étant de préférence compris entre 0 et 30,5.

L'invention a également pour objet les produits phytosanitaires comprenant au moins un oligosaccharide glycuronane à enchaînement  $\beta(1-4)$ , tels que les oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronane, les oligo 1,4  $\beta$ -D-mannuronane, et les oligo 1,4  $\beta$ -D-guluronane, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15.

L'invention a plus particulièrement pour objet les produits phytosanitaires comprenant au moins un dérivé oligosaccharidique glycuronique choisi parmi les suivants :

- les oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de DP8, et de DP moyen 8,
- l'oligo 1,4  $\beta$ -D-mannuronane de DP4,
- l'oligo 1,4  $\beta$ -D-guluronane de DP4.

L'invention concerne plus particulièrement les produits biofertilisants comprenant au moins un oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronane, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15, et, de préférence, les produits biofertilisants comprenant les oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de DP8, et de DP moyen 8.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de la préparation des polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes et oligosaccharides glycuroniques dérivés selon l'invention, ainsi que de la mise en évidence de leurs propriétés d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase, et/ou de l'enzyme 1,4  $\beta$ -D-glucanase.

### A) Préparation des polymères uroniques et/ou de leurs oligosaccharides

L'obtention des polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes fait appel, de préférence, à des procédés de fermentation de souches bactériennes isolées de la rhizosphère (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*...), modifiées ou non par mutations chimiques et/ou manipulations génétiques.

Le cas échéant, les polymères ainsi obtenus sont modifiés et/ou dégradés par voies chimiques et/ou enzymatiques, en cours de fermentation ou par des traitements post-fermentaires.

- Polymère 1,4  $\beta$ -D-glucuronane

A titre d'illustration, le polymère 1,4  $\beta$ -D-glucuronane est obtenu par fermentation d'une souche mutée de *Rhizobium meliloti*, selon le protocole décrit dans le brevet français FR-B-2 688 222 du 3 mars 1992.

- Oligomère 1,4- $\beta$ -D-glucuronane de DP moyen 8

Le polymère précédent natif, c'est à dire comportant au moins 50% d'unités glucuroniques acétylées en C2 et ou C3, est soumis à une hydrolyse enzymatique. L'enzyme est une glucuronate lyase d'origines diverses, notamment extraite de pancréas d'ormeaux, ou d'origine fongique (Dantas L. et al., Carbohydr. Res., 265(1994) 303-310) ou une glucuronate lyase présente dans le milieu de culture de bactéries telles que les souches de rhizobiaceae (Michaud P., et al., Int. J. Biol. Macromol. 21 (1997) 3-9). Le mélange d'oligosaccharides ainsi obtenu est déacétylé par traitement basique (NaOH 0,1M), puis fractionné en fonction du degré de polymérisation (DP) par chromatographie de perméation de gel sur colonne de Bio-Gel P6 (Dantas L. et al., susmentionné).

- Oligomères 1,4  $\beta$ -D-mannuronane et 1,4  $\beta$ -D-guluronane de DP 4

Le polymère de départ est un alginat, copolymère linéaire des acides mannuronique (M) et guluronique (G) dont le rapport M/G et le mode d'arrangement dépendent de

l'origine. L'alginate est choisi en fonction du type d'oligomères à préparer. L'hydrolyse se fait par voie enzymatique: une alginate-lyase d'ormeau pour les oligo-1,4 $\beta$ -D-mannuronane (Heyraud A. et al., Carbohydr. Res., 291 (1996) 115-126), une alginate-lyase d'origine bactérienne pour les oligo-1,4  $\beta$ -D-guluronane (brevet FR 97 03218 du 11 mars 1997). Les différents oligosaccharides, séparés selon le DP par chromatographie de perméation de gel, sont ensuite purifiés selon leur structure par chromatographie ionique en chromatographie liquide haute pression selon le procédé décrit dans l'article de Heyraud et al., susmentionné.

B) Réponse 1,3- $\beta$ -D-glucanase induite dans des protoplastes de *Rubus*.

Conditions expérimentales : (1) préparation de protoplastes à partir de suspensions cellulaires de *Rubus fruticosus* L.; (2) incubation ou non de n échantillons de  $2.10^6$  protoplastes en présence "d'éléciteur" (polymères 1,4- $\beta$ -D-glucuronane et 1,4- $\beta$ -D-galacturonane (400  $\mu$ g/L), oligomères 1,4- $\beta$ -D-glucuronane de DP moyen 8, 1,4- $\beta$ -D-mannuronane de DP 4, et 1,4- $\beta$ -D-guluronane de DP 4 (50 nM); (3) après 20 min, les protoplastes traités ou non font l'objet d'une extraction enzymatique. 2  $\mu$ g de protéines sont utilisées par essai enzymatique, et par temps d'incubation. La viabilité des protoplastes est maintenu à 95 % pour une durée d'expérimentation de 6h; le test de viabilité au bleu d'Evans utilisé vérifie l'intégrité du plasmalemme.

Méthodologie : la mesure de l'activité (1,3  $\beta$ -D-glucanase) repose sur le dosage colorimétrique (test au ferricyanure) des unités réductrices du substrat (hexamère réduit de laminarine) libérées au cours de l'hydrolyse. A partir des cinétiques développées, on trace des courbes dont les équations permettent de calculer la vitesse de la réaction enzymatique. 2 cinétiques, au moins, sont développées par échantillon, et par "set" expérimental. En général, 8 cinétiques provenant d'échantillons de 2 "sets " indépendants sont, au moins, développées.

Résultats : l'activation enzymatique dans des protoplastes élicités est exprimée en % de l'activité dans les contrôles. Les résultats sont rapportés dans le tableau récapitulatif 1.

5

Tableau 1

"éliciteur"	activité (% contrôle)
a	145
b	128
c	100
d	122
e	146

Tableau 1: Analyse comparative des réponses (1,3- $\beta$ -D-glucanase) induites par "l'éliciteur" (polymère 1,4- $\beta$ -D-glucuronane (400  $\mu$ g/L) (a), oligo 1,4- $\beta$ -D-glucuronane de DP moyen 8 (50 nM) (b), polymère 1,4- $\beta$ -D-galacturonane (400  $\mu$ g/L) (c), oligo 1,4- $\beta$ -D-mannuronane de DP 4 (50 nM) (d), oligo 1,4- $\beta$ -D-guluronane de DP 4 (50 nM) (e).

10

L'analyse électrophorétique par SDS-PAGE des protéines composant les extraits enzymatiques a été réalisée. Le marquage de protéines sur empreintes par un sérum reconnaissant des 1,3- $\beta$ -D-glucanases isolées du tabac contaminé par la mosaïque du tabac (Ori et al. (1990) EMBO J., 9(11), 3429-36) confirme la présence de PR-protéines.

15

L'oligomère 1,4- $\beta$ -D-glucuronane de DP moyen 8 et le polyglucuronane, utilisés à une concentration nanomolaire, amplifie en 20 min d'un facteur 1.5 et 1.3 respectivement l'activité 1,3  $\beta$ -D-glucanase dans des protoplastes végétaux. Parmi les autres produits testés, c'est l'oligo 1,4- $\beta$ -D-guluronane de DP4 qui est le plus efficace.

20

C) Réponse 1,4- $\beta$ -D-glucanase induite dans des protoplastes de *Rubus*.

Conditions expérimentales d'élicitation : identiques à celles rapportées ci-dessus.

5

Méthodologie : la mesure de l'activité (1,4  $\beta$ -D-glucanase) repose sur le dosage colorimétrique (test au ferrieyanure) décrit ci-dessus des unités réductrices du substrat (cellopentaose réduit) libérées au cours de l'hydrolyse.

Résultats : les résultats sont rapportés dans le tableau 2.

Tableau 2

"éliciteur"	activité (% contrôle)
a	100
b	120
c	100
d	-
e	101

Tableau 2: Analyse comparative des réponses (1,4  $\beta$ -D-glucanase) induites par "l'éliciteur" (polymère 1,4- $\beta$ -D-glucuronane (400  $\mu$ g/L) (a), oligo 1,4- $\beta$ -D-glucuronane de DP moyen 8 (50 nM) (b), polymère 1,4- $\beta$ -D-galacturonane (400  $\mu$ g/L) (c), oligo 1,4- $\beta$ -D-mannuronane de DP 4 (50 nM) (d), oligo 1,4- $\beta$ -D-guluronane de DP 4 (50 nM) (e).

15

L'oligomère 1,4- $\beta$ -D-glucuronane de DP moyen 8 utilisé à une concentration nanomolaire, amplifie en 20 min d'un facteur 1.2 l'activité 1,4  $\beta$ -D-glucanase dans des protoplastes végétaux.

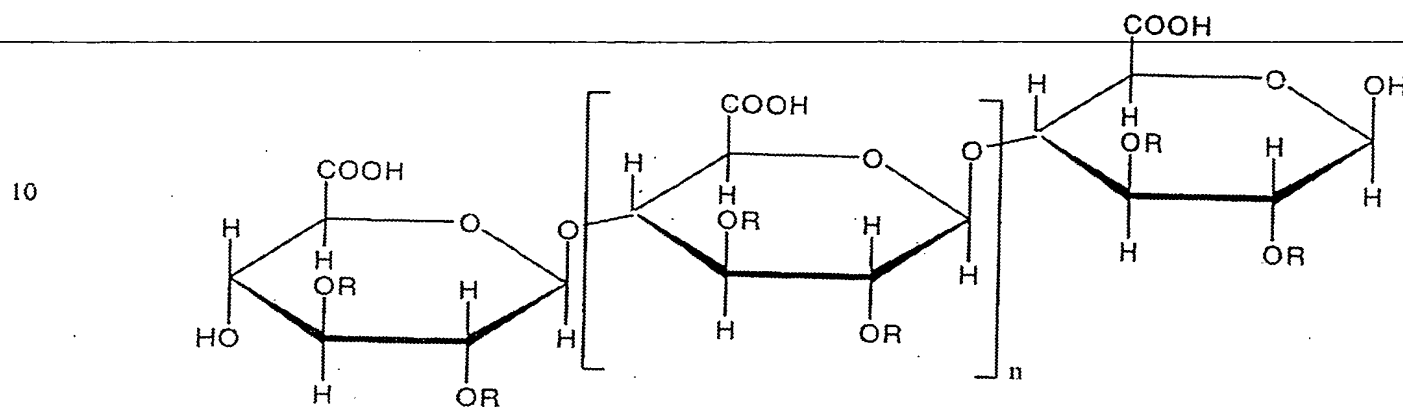
20

## REVENDEICATIONS

1. Utilisation de composés choisis parmi :

- les polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de formule (I) suivante :

5



15

dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H ou  $\text{COCH}_3$ ,

20

- et/ou les oligosaccharides glycuroniques à enchaînement  $\beta(1-4)$  dérivés des polymères de formule (I), et dont le nombre d'unités saccharidiques est inférieur à environ 30.

- et /ou les esters et/ou éthers correspondants aux polymères de formule (I) ou aux dérivés oligosaccharidiques susmentionnés,

25

\* en tant que produits phytosanitaires dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase.

\* et/ou en tant que biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase et/ou de l'enzyme 1,4  $\beta$ -D-glucanase.

30

2. Utilisation selon la revendication 1, des composés choisis parmi ceux cités dans la revendication 1, en tant que produits phytosanitaires dans le cadre d'applications liées à leur



activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase, telles que la protection des plantes contre les pathogènes, notamment contre les bactéries, les virus, les champignons, ou l'adaptation des plantes à un stress abiotique, notamment l'adaptation au froid ou à des teneurs élevées en ozone.

5

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, des polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H.

4. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, des polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, R représente H ou COCH<sub>3</sub>, le pourcentage de COCH<sub>3</sub> en poids étant de préférence compris entre 0 et 30,5.

15

5. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, d'oligosaccharides glycuroniques à enchaînement  $\beta$ (1-4), tels que les oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronane, les oligo 1,4  $\beta$ -D-mannuronane, et les oligo 1,4  $\beta$ -D-guluronane, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15.

20

6. Utilisation selon la revendication 5, des oligosaccharides glycuroniques choisis parmi les suivants:

- les oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de DP8, et de DP moyen 8,
- l'oligo 1,4  $\beta$ -D-mannuronane de DP4,
- l'oligo 1,4  $\beta$ -D-guluronane de DP4.

25

7. Utilisation selon la revendication 1, des composés choisis parmi ceux cités dans la revendication 1, en tant que produits biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase et/ou de l'enzyme 1,4  $\beta$ -D-glucanase.

30

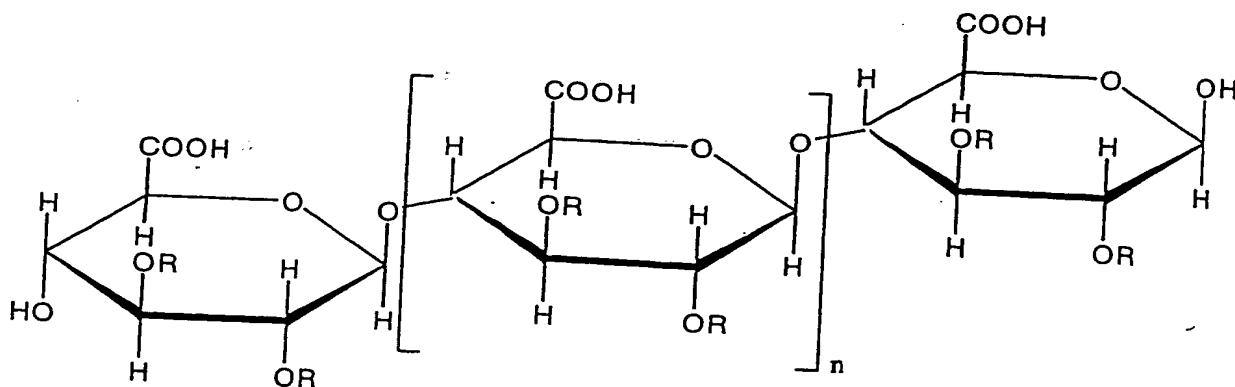
8. Utilisation selon la revendication 7, des oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15, en tant que produits biofertilisants dans le cadre d'applications liées à leur activité d'amplification de l'enzyme 1,3  $\beta$ -D-glucanase et de l'enzyme 1,4  $\beta$ -D-glucanase, notamment dans le cadre du contrôle d'une ou plusieurs étapes de développement des plantes, tels que le contrôle de la maturation des fruits, de l'abscission, de la croissance du pistil ou de la maturation des anthères.

9. Utilisation selon la revendication 8, de l'oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronane de DP moyen

8.

10. Produits phytosanitaires et/ou biofertilisants caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un composé choisi parmi :

- les polymères 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de formule (I) suivante :



dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H ou COCH<sub>3</sub>,

- et/ou les oligosaccharides glycuroniques à enchaînement  $\beta$ (1-4) dérivés des polymères de formule (I), et dont le nombre d'unités saccharidiques est inférieur à environ 30,

- et /ou les esters et/ou éthers correspondants aux polymères de formule (I) ou aux dérivés oligosaccharidiques glycuroniques susmentionnés.

5 11. Produits phytosanitaires selon la revendication 10, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un polymère 1,4  $\beta$ -D-glucuronane de formule (I) dans laquelle n est un nombre entier compris entre environ 300 et environ 2500, et R représente H.

---

12. Produits phytosanitaires selon la revendication 10, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un oligosaccharide glycuronane à enchaînement  $\beta(1-4)$ , tels que les oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronane, les oligo 1,4  $\beta$ -D-mannuronane, et les oligo 1,4  $\beta$ -D-guluronane, dont le DP est inférieur à 20, et de préférence compris entre 5 et 15.

13. Produits phytosanitaires selon la revendication 12, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un oligosaccharide glycuronique choisi parmi les suivants :

- 15
- les oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronanes de DP8, et de DP moyen 8,
  - l'oligo 1,4  $\beta$ -D-mannuronane de DP4,
  - l'oligo 1,4  $\beta$ -D-guluronane de DP4.

20 14. Produits biofertilisants selon la revendication 10, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronane, dont le DP est inférieur à environ 30, et de préférence compris entre 2 et 15, tel que l'oligo 1,4  $\beta$ -D-glucuronane de DP moyen 8.

